

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Левтун Ігор Ігорович

УДК 57.043: 57.044: 620.951

**Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з
підвищеним вмістом ліпідів**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації
на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України (м. Київ).

Науковий керівник: доктор технічних наук, старший науковий співробітник, доцент **Голуб Наталія Борисівна**,
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
МОН України, професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики.

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник
Карпенко Олена Володимирівна,
Відділення фізико-хімії горючих копалин Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка
НАН України, завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин;

кандидат технічних наук, доцент
Красінько Вікторія Олегівна,
Національний університет харчових технологій МОН України,
доцент кафедри біотехнології і мікробіології.

Захист дисертації відбудеться *7 квітня 2017 р.* о *12-00* годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп.4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім.Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Автореферат розіслано «__» _____ 2017 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28,
д.біол.н., доц.



Галкін О.Ю.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Щорічно в Україні споживається близько 200 мільйонів тонн умовного палива, при цьому видобуток з природних джерел країни становить лише 80 млн. тонн. При такому балансі власної та імпортованої енергетичної сировини важливим потенційним ресурсом може стати біопаливо, джерелом якого є водорості.

В клітинах мікроводоростей загальний вміст ліпідів – джерела для отримання біодизельного палива, коливається у значному діапазоні. При цьому кількість та якісний склад ліпідів залежить від умов технологічного процесу культивування мікроводоростей. Також в Україні відсутні штами мікроводоростей, які можуть накопичувати ліпіди у концентрації до 70%. Тому дослідження можливості підвищення біосинтезу ліпідної фракції поширеними мікроводоростями, наприклад, *Chlorella vulgaris*, є актуальною проблемою.

Процес продукування біомаси перебігає краще за оптимальних умов культивування, а біосинтез підвищеного вмісту ліпідів у клітинах - за умов незбалансованості живильного середовища або за стресових умов. Тому створення ефективних для продукування ліпідів стресових умов одночасно з високим виходом біомаси є актуальною проблемою для розробки технологій культивування мікроводоростей з метою одержання біодизельного палива.

З відомих методів підвищення виходу ліпідної фракції найбільш ефективними вважаються хімічні методи, тобто регуляція вмісту поживних речовин, нестача або надлишок яких призводить до накопичення ліпідів. Використання хімічних методів у комбінації з фізичними може посилити їх вплив на метаболізм мікроводоростей і збільшити вихід ліпідів.

Ультразвукове опромінення завдяки своїй фізичній та фізіологічній дії може бути потенційно ефективним та легко контрольованим стресовим фактором. На теперішній час відсутні дані щодо впливу ультразвукового опромінення на мікроводорості. Виходячи з результатів досліджень дії ультразвукового опромінення на інші види одноклітинних організмів, можна вважати, що вплив ультразвуку буде подібним і для мікроводоростей. Тому актуальним є дослідження впливу ультразвукового опромінення на зміну метаболізму мікроводоростей.

Також відомим, але малодослідженим фактором, що потребує обґрунтування, є вплив комбінації довжин хвиль світлового опромінення на розвиток культури мікроводоростей. Відомо, що мікроводорості *Chlorella vulgaris* потребують освітлення різними діапазонами хвиль. Зміна комбінації довжин хвиль та їх інтенсивність повинна впливати на ефективність фотосинтезу та накопичення ліпідної фракції. Тому дослідження впливу комбінації діапазонів довжин хвиль видимого спектру на розвиток *Chlorella vulgaris* є актуальною проблемою.

Використання комбінації перерахованих фізичних впливів може значно збільшити вихід ліпідної фракції і, як наслідок, біодизельного палива. Тому обґрунтування та дослідження раціональних параметрів процесу культивування *Chlorella vulgaris*, що призводить до підвищеного біосинтезу ліпідної фракції, є актуальною проблемою, вирішенню якої присвячена робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського». Тема дисертаційної роботи відповідає пріоритетним напрямкам розвитку науки і техніки «Раціональне природокористування» та стратегічним пріоритетним напрямкам інноваційної діяльності в Україні на 2010 – 2020 роки: «Вдосконалення хімічних технологій, нові матеріали, розвиток біотехнологій». Роботу виконано за темами кафедри екобіотехнології та біоенергетики: «Фотобіоелектрохімічна конверсія відходів і біосировини з одержанням електричної енергії та енергоносіїв», № ДР 0113U001650 (2013 – 2014 р.), виконавець; «Отримання енергоносіїв з відходів виробництва біодизельного палива, промислових стоків, мікроводорості *Chlorella vulgaris* та відходів її культивування», № ДР 0115U000399 (2015 – 2016 р.), виконавець.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є розробка технологічних рішень культивування *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів як сировини для одержання біодизельного палива.

Для досягнення мети передбачено виконання таких задач:

- спроектувати та сконструювати експериментальну лабораторну установку для дослідження впливу світлового та ультразвукового опромінення;
- встановити вплив звукових коливань різної частоти на динаміку приросту біомаси та продукування ліпідів культурою мікроводоростей *Chlorella vulgaris*;
- дослідити вплив низькочастотного ультразвукового опромінення на розвиток мікроводоростей та продукування ліпідів *Chlorella vulgaris*;
- визначити вплив співвідношення різних довжин хвиль світлового опромінення та їх інтенсивності на розвиток культури *Chlorella vulgaris*;
- дослідити одночасний вплив джерела нітрогену, освітлення хвилями різної довжини опромінення ультразвуком на приріст біомаси та ліпідів *Chlorella vulgaris*;
- обґрунтувати та визначити раціональні параметри процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів у клітинах;
- розробити технологічну і апаратурну схеми культивування мікроводоростей для одержання з них біодизельного палива.

Об'єкт дослідження. Процес культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів для одержання біодизельного палива.

Предмет дослідження. Раціональні параметри процесу культивування *Chlorella vulgaris* за використання комбінації ультразвукового та світлового опромінення хвилями різної довжини.

Методи дослідження. Для спостереження за формуванням колоній мікроводоростей, зміною забарвлення та розмірів клітин, їх підрахунку застосовували метод мікроскопії. Для дослідження динаміки приросту біомаси та вмісту хлорофілів використовували спектрофотометричний метод аналізу. Для визначення кількості біомаси мікроводоростей та ліпідів застосовували ваговий метод. Для виділення ліпідів з біологічного матеріалу використовували метод Сокслета, для визначення якісного складу ліпідної фракції – хроматографічний метод. Графічне оформлення даних та обробку результатів досліджень здійснено за

допомогою програмного забезпечення MS Excel. Креслення схем виконано за допомогою програмного забезпечення “Аскон Компас”.

Наукова новизна одержаних результатів. Основні положення дисертаційних досліджень, які визначають наукову новизну одержаних результатів:

- вперше визначено вплив низькочастотного ультразвукового опромінення на процес культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, що дозволило встановити раціональні довжини хвиль для підвищеного біосинтезу ліпідної фракції (триацилгліцеролів);
- вперше визначено необхідні діапазони хвиль світлового опромінення та їх співвідношення для культивування *Chlorella vulgaris*, що дало змогу підвищити вихід біомаси мікроводоростей та ліпідної фракції;
- вперше встановлено синергічний вплив хімічних (джерело нітрогену) та фізичних (ультразвукове опромінення, освітлення) факторів, що дало змогу встановити раціональні параметри процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом триацилгліцеролів;
- дістало подальший розвиток визначення впливу джерел нітрогену та їх комбінацій на метаболізм *Chlorella vulgaris*, що дало можливість підвищити вихід ліпідів за сумісної дії іонів амонію та сечовини.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення роботи полягає у вирішенні актуальної проблеми суспільства - заміни традиційних енергоносіїв відновлювальними екологічно чистими джерелами енергії. Одержано такі практичні результати:

- визначені раціональні параметри біотехнологічного процесу культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* дозволяють підвищити вміст ліпідної фракції у клітинах до 55% без зниження приросту біомаси, що дає змогу їх використання як сировини для отримання біодизельного палива. Одночасно відбувається утворення високоякісного добрива. На підприємстві ТОВ «Авангард» Жашківського району Черкаської області проведено дослідно-промислове випробування біотехнології культивування *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів (Акт впровадження від 06.09.2016 р.);
- запропоноване використання комбінації світлодіодів з хвилями різної довжини для освітлення та опромінення ультразвуковими хвилями низької частоти дає змогу підвищити вихід біомаси мікроводоростей у 3 ÷ 4 рази та вміст ліпідів, що знижує енергетичні витрати на процес культивування.

Результати проведених досліджень впроваджено у навчальний процес підготовки фахівців за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» спеціалізації «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» при підготовці дисциплін «Водорості в біоенергетиці» та «Переробка біомаси» (Акт впровадження від 08.09.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Всі основні результати дисертаційної роботи отримано здобувачем особисто. Внесок дисертанта включає: розробку та конструювання лабораторної установки культивування мікроводоростей з можливістю регулювання подачі вуглекислого газу, терміну освітлення, температури, швидкості перемішування барботажним повітрям; конструювання

системи освітлення комбінаціями світлодіодів, системи опромінення хвилями різної частоти; проведення експериментів з культивування мікроводоростей під дією змінних фізичних та хімічних факторів (джерело нітрогену, ультразвукове опромінення, освітлення); визначення оптичної густини суспензії та спостереження за культурою; створення технологічних та апаратурних схем процесів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на щорічних конференціях: XIII-XV міжнародних науково-практичних конференціях «Відновлювана енергетика XXI століття». – Крим, 2012 (10–14 вересня), Крим, 2013 (16–20 вересня), Київ, 2014 (16–17 вересня), XVI – XVII міжнародних науково-практичних конференціях «Відновлювана енергетика та енергоефективність XXI століття». – Київ, 2015 (28–29 травня), Київ, 2016 (29–30 вересня); XV міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Екологія. Людина. Суспільство», Київ, 2012 (26–30 вересня); Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», Київ, 2015 (22–23 жовтня); IX–X Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Біотехнологія XXI століття», Київ, 2015 (24 квітня), Київ, 2016 (22 квітня).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, з них 5 наукових статей у фахових виданнях, (з них 1 – у виданні іноземних держав, 2 статті у фахових виданнях України, що входять до міжнародних наукометричних баз); 1 патент України на винахід; 1 патент України на корисну модель; 13 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Викладена на 119 сторінках, містить 30 рисунків, 8 таблиць, 149 найменувань джерел літератури, 4 додатки на 17 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та задачі досліджень, показано наукову новизну, практичну цінність одержаних результатів, наведено відомості про апробацію результатів роботи.

Перший розділ складається з огляду джерел літератури за темою дисертаційної роботи. Дослідженням процесу культивування мікроводоростей та зміною їх метаболізму під впливом фізичних та хімічних факторів займалися: Becker E.W., Caner K., Chen C.Y., Choi B., Choi Y.K., Chisti Y., Harwood J.L., Sunjin K., Золотарьова О.К., Романенко В.Д., Упитис В.В. та інші.

Розглянуто фактори впливу на метаболітичні процеси мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. Оскільки відсутні джерела літератури щодо дії ультразвукового опромінення на клітини мікроводоростей, було проаналізовано його вплив на клітини бактерій, грибів та вищих рослин. Показано, що зміна метаболізму залежить від частоти опромінення, його інтенсивності та тривалості дії. Причому, опромінення може викликати як руйнацію клітин, так і бути стимулюючим фактором розвитку.

З'ясовано вплив зовнішніх факторів, таких як освітлення та природа джерела нітрогену, на метаболізм та швидкість продукування ліпідів клітинами мікроводоростей. Показано, що для різних видів мікроводоростей приріст біомаси і якісний склад ліпідів залежить від джерела нітрогену, оскільки механізми його засвоєння залежать від ферментативного складу клітин та потребують витрат енергії при переведенні N^{5+} до N^{3-} . При нестачі нітрогену підвищується вихід ліпідів, але уповільнюється швидкість росту. Споживання мікроводоростями різних форм нітрогену впливає на значення рН середовища і, відповідно, на розвиток та метаболізм клітин. Не визначено раціональне джерело нітрогену, яке сприяє біосинтезу ліпідів без зниження приросту біомаси.

У джерелах літератури наведено суперечливі дані щодо оптимального режиму освітлення та комбінації частот видимого спектру. Показано, що за різних довжин хвиль процеси фотосинтезу відбуваються з різною інтенсивністю, що впливає на метаболізм мікроводоростей. Встановлено, що для нормального росту мікроводоростей необхідно використовувати довжини хвиль червоного та синього діапазонів. Застосування тільки червоних світлодіодів робить неактивним хлорофіл *a*, що знижує інтенсивність фотосинтезу і, відповідно, приріст біомаси. При опроміненні синіми світлодіодами спектр частот уловлюється хлорофілом *a* та каротиноїдами, але при цьому не активний хлорофіл *b*, що також знижує швидкість приросту біомаси. Показано, що найбільш раціональною є комбінація червоних та синіх світлодіодів у співвідношенні 1:1, але за такого співвідношення культура росте у зоні освітлення, припиняючи ріст у зоні затемнення. Також за такого спектру освітлення не задіяні усі каротиноїди. Освітлення білими світлодіодами, які випромінюють усі частоти видимого спектру, призводить до активації як хлорофілів, так і каротиноїдів, але має більший ступінь розсіювання, що знижує проникність світла у культуральне середовище. Не визначено раціональної комбінації довжин хвиль для продукування *Chlorella vulgaris* триацилгліцеролів – сировини для отримання біодизельного палива.

На основі даних літератури сформульовано завдання дисертаційної роботи.

Другий розділ містить відомості про методи, обладнання і методики досліджень, методики культивування мікроводоростей, приготування поживного середовища. Наведено схеми устаткування та описано принципи його роботи. Наведено методи відділення біомаси від культурального середовища, виділення ліпідної фракції, визначення хлорофілів. Для визначення загального вмісту ліпідів використовували метод Сокслета. Ваговий метод використовували для визначення загального виходу біомаси та ліпідів. Для кількісного визначення приросту клітин використовували оптичні методи дослідження: мікроскопічний з застосуванням камери Горяєва та спектрофотометрію. Методи газо-рідинної хроматографії використовували для визначення якісного та кількісного складу ліпідної фракції.

У третьому розділі наведено дослідження впливу різних частот звукового та ультразвукового опромінення на культуру мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. Для визначення раціональної частоти опромінення для інтенсифікації процесів росту та підвищення біосинтезу ліпідної фракції досліджували вплив частот звукового випромінювання у межах від 5 до 15 кГц з кроком у 5 кГц, та ультразвукового від 20

до 25 кГц з кроком у 2,5 кГц. Культивування проводили за використання середовища Громова №6 та природного освітлення.

Було встановлено, що дія звукового опромінення частотами $5 \div 15$ кГц та ультразвукового 20 кГц, культури *Chlorella vulgaris* призводить до підвищеного у $1,5 \div 3$ рази біосинтезу ліпідів у клітинах по відношенню до культивування без опромінення (рис.1), що дає змогу застосовувати метод опромінення для керованого синтезу ліпідної фракції – сировини для отримання біодизельного палива.

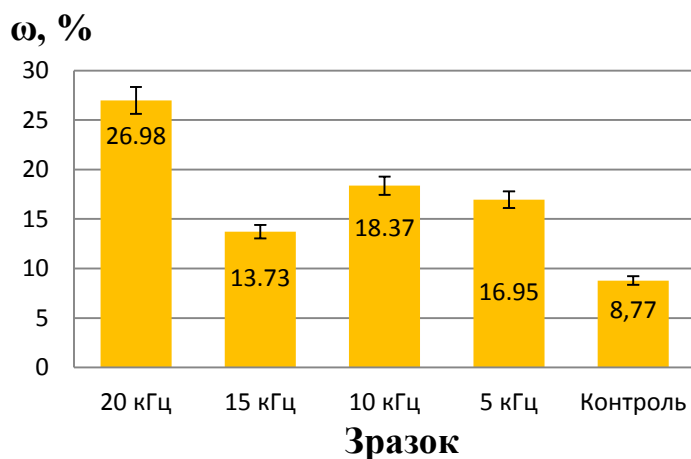


Рис. 1. Питомий вміст ліпідної фракції (ω) у біомасі *Chlorella vulgaris* в залежності від дії звукових коливань частотою 5, 10, 15, 20 кГц та без опромінення (контроль), температура - 18 ± 2 °C. $P \leq 0,05$.

Одержані результати показали, що більший вплив на розвиток та метаболізм клітин має дія ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. Під дією ультразвуку відбувається інтенсифікація масообміну через мембрани за рахунок їх деполаризації та мікроциркуляції органічних та неорганічних сполук, що підвищує активний транспорт живильних речовин через мембрану. Це призводить до збільшення розміру клітин ($5 \div 10$ мкм порівняно з клітинами, які не опромінювали - $2 \div 6$ мкм) та швидкості накопичення біомаси.

Також опромінення ультразвуковою частотою впливає на ступінь осадження клітин на поверхні фотореактора і формуванню колоній. Під дією ультразвуку відбувається руйнування колоній, відділення клітин від стінок реактора і, як наслідок, зменшення зон затемнення і покращення освітлення культури, що також призводить до підвищення швидкості біосинтезу і приросту біомаси.

Опромінення мікроводоростей ультразвуковими частотами $20 \div 25$ кГц здійснювали протягом 1 хвилини, температура - 28 ± 2 °C. Підвищення температури скорочує термін лаг фази і збільшує тривалість фази експонентного росту, що сприяє накопиченню біомаси мікроводоростей. Підвищення температури з 18 до 28 °C підвищує як приріст біомаси у 4,5 разів, так і ліпідної фракції у 2 рази при опроміненні частотою 20 кГц.

Завдяки рідинно-кристалічній структурі мембран опромінення призводить до збільшення рухливості ліпідів біліпідного шару, що позитивно впливає на швидкість полегшеної дифузії і іонного транспорту. Внаслідок постійного руху молекул мембрани розмір окремої ділянки поверхні клітини постійно змінюється, що створює потоки середовища до клітини і від неї. Це призводить до більш швидкого руху іонів навколо клітинного простора. Рух молекул в шарі мембрани, в цілому, також призводить до переміщення іонних каналів і транспортних білків, що в свою

чергу прискорює частоту взаємодії їх з відповідними іонами і молекулами. Більша швидкість обміну речовин призводить до більш швидкого росту клітин.

При підвищенні частоти опромінення можливе виникнення ефекту кавітації, або порушення структури мембран, що призводить до значних пошкоджень у клітині. Це підтверджується даними щодо приросту біомаси за дії частоти 25 кГц (рис.2). На відміну від дії більш низьких частот при застосуванні опромінення частотою 25 кГц зменшується тривалість фази експонентного росту. В цьому випадку загальна кількість клітин знижується по відношенню до культури, яку опромінювали ультразвуком з більш низькими частотами, але перевищує приріст клітин за стандартних умов культивування.

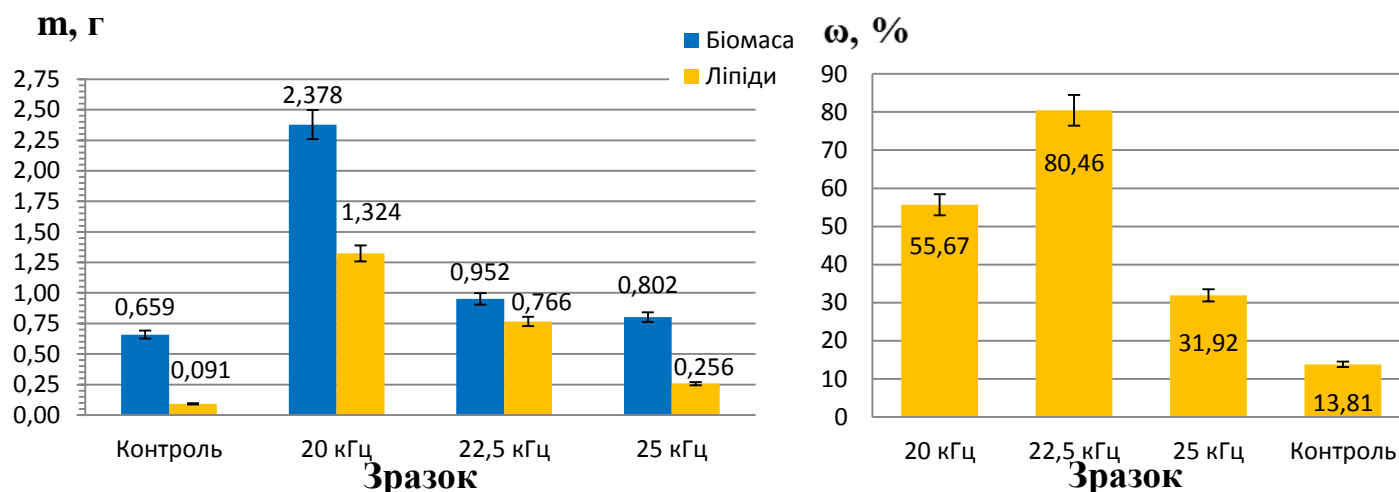


Рис. 2. Приріст біомаси та вміст ліпідної фракції (m) у *Chlorella vulgaris* в залежності від дії частоти ультразвукового опромінення. $P \leq 0,05$.

Рис. 3. Масова частка ліпідної фракції (ω) *Chlorella vulgaris* в залежності від дії частоти ультразвукового опромінення. $P \leq 0,05$.

У відповідності до приросту біомаси мікроводоростей найбільшу кількість ліпідів за період культивування одержано за використання ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. По відношенню до контрольного зразка маса ліпідів при дії опромінення частотою 20 кГц збільшується у 14,5 разів, при 22,5 кГц - у 8,4 рази, при 25 кГц - у 2,8 рази.

На рис. 3 наведено питомий вміст ліпідів у сухій біомасі за 30 діб культивування. Так, найбільша масова частка ліпідів ($80 \pm 2\%$) характерна для культури при опроміненні її ультразвуком частотою 22,5 кГц, що у 5,8 разів більша за контрольної культури (13,81%). При дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц масова частка ліпідів складає $55 \pm 2\%$; при дії частоти 25 кГц - $32 \pm 1\%$, що у 4 та 2,3 рази більше, відповідно, по відношенню до стандартних умов культивування. Незважаючи на те, що питомий вміст ліпідів при дії ультразвукового опромінення 22,5 кГц у 1,4 рази більший, ніж при опроміненні ультразвуком частотою 20 кГц (рис.3), загальний вихід ліпідів у 1,7 разів більший при дії частоти у 20 кГц, завдяки значному приросту біомаси за період культивування. Зменшення вмісту ліпідів при дії опромінення частотою 25 кГц можливо пов'язано як з уповільненням процесів біосинтезу, так і зі зміною напрямку метаболічних процесів на відновлення структури мембран, захист від радикалів тощо.

Вперше встановлено, що дія опромінення ультразвуковими частотами дає змогу створити умови для зміни метаболізму клітин в бік утворення ліпідної фракції і можливості використання *Chlorella vulgaris* як продуцента сировини для отримання біодизельного палива. Дія ультразвукового опромінення частотою 20 кГц є раціональною порівняно з іншими частотами для культивування біомаси *Chlorella vulgaris* та продукування нею ліпідної фракції.

Четвертий розділ присвячено дослідженню дії частот видимого спектру, їх інтенсивності та співвідношення на ріст та розвиток мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Діапазон спектру випромінювання обирали з урахуванням вмісту пігментів, що характерні для *Chlorella vulgaris*. Хлорофіл *a* має максимуми поглинання при довжинах хвиль 450 та 675 нм. Для забезпечення таких діапазонів використовуються світлодіоди кольору індиго (430 ÷ 450 нм) та червоні (640 ÷ 700 нм). Для хлорофілу *b* характерне поглинання при 475 та 625 нм, яким відповідають сині (450 ÷ 480 нм) та помаранчеві (615 ÷ 625 нм) світлодіоди. Хлорофіл *a*, який міститься у фотосистемі I і є первинним акцептором електронів, має максимум поглинання при 695 нм - кінець червоного спектру. Освітлення культури здійснювали за допомогою комбінацій 10 або 20 світлодіодів: 1 - білі (колірна температура 5500 К), 2 - червоні/сині (3:2), 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві (2:2:5:1), відповідно, 4 - сині/червоні/зелені (1:1:1). Для останньої комбінації використовували 9 та 18 світлодіодів.

Встановлено, що різні комбінації довжин хвиль опромінення призводять не лише до різного виходу біомаси та ліпідної фракції, а й до змін у кольорі клітин та формі колоній, що пов'язано з інтенсивністю фотосинтетичних процесів. На рис. 4 наведено приріст біомаси за 14 діб культивування при освітленні різними комбінаціями світлодіодів та за різної інтенсивності.

При низькій інтенсивності освітлення (10 світлодіодів) максимальний приріст біомаси характерний для культивування при дії природного освітлення. З підвищенням інтенсивності освітлення більший приріст біомаси у випадку застосування комбінації червоного/синього/зеленого діапазонів можна пояснити більшими розмірами клітин, та наявністю випромінювання, що характерно для зеленого кольору. Освітлення зеленим спектром сприяє фіксації CO₂ клітинами в глибині фотореактора та збільшує швидкість його перетворення в органічні речовини, що призводить до більшого приросту біомаси.

Наведені результати суперечать висновкам, що одержані іншими дослідниками, де максимальний приріст біомаси характерний для освітлення білими або синіми світлодіодами. Таку розбіжність можна пояснити різною інтенсивністю опромінення, що застосовували у роботах. Оскільки червоний спектр має знижену інтенсивність і, відповідно, для одержання коректних результатів для співставлення необхідно використовувати для них більшу потужність.

У табл. 1 наведено зміну вмісту хлорофілів *a* та *b* при вирощуванні мікроводоростей за різного освітлення культури. Так, кількість хлорофілу *a* при застосуванні природного освітлення та білих світлодіодів однакова, але в останньому випадку збільшується кількість хлорофілу *b*.

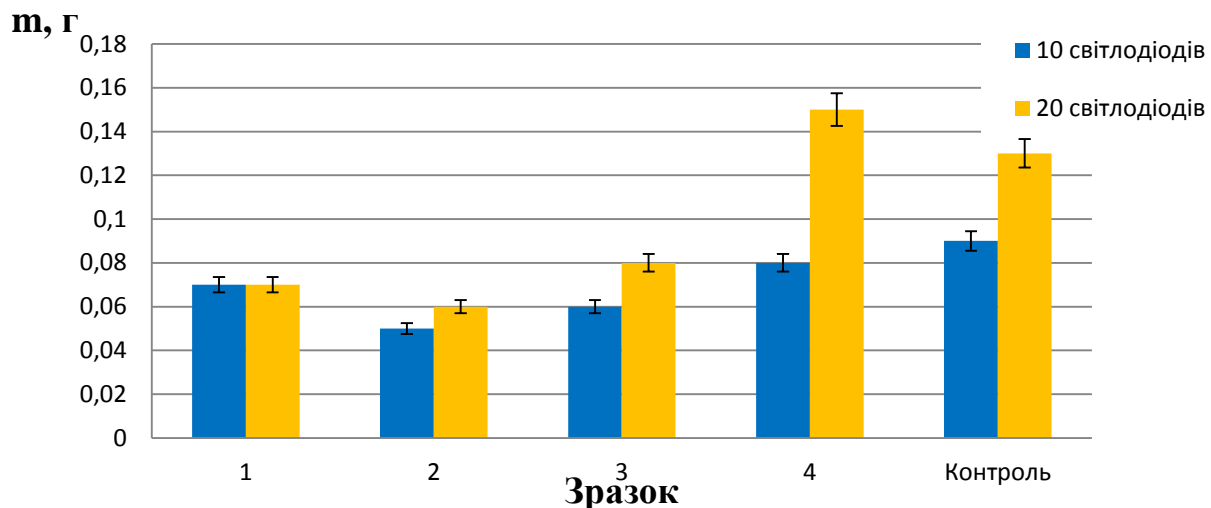


Рис. 4. Вихід біомаси *Chlorella vulgaris* (m) при освітленні комбінаціями світлодіодів за низької інтенсивності (10 світлодіодів, сині стовпчики) та високої (20 світлодіодів, жовті стовпчики): 1 - білі, 2 - сині/червоні (2:3), 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві (2:2:5:1), відповідно, 4 - сині/червоні/зелені (1:1:1), контроль - природне освітлення. $P \leq 0,05$.

Використання комбінацій світлодіодів з перевагою червоного кольору (табл. 1, позиції 2, 3) призводить до підвищеного вмісту хлорофілу *a* по відношенню до контролю у 1,9 та 2,6 разів та хлорофілу *b* у 2,2 та 4,5 рази, відповідно. Підвищення вмісту хлорофілів по відношенню до клітин, що вирощені під дією природного освітлення, можна пояснити низькою інтенсивністю світла, що надають такі комбінації світлодіодів. У той самий час застосування комбінації світлодіодів червоного/синього/зеленого кольорів знижує біосинтез хлорофілу *b* по відношенню до природного освітлення у 4,8 рази, що змінює забарвлення клітин до насиченого зеленого кольору. Таке освітлення проникає на більшу глибину у фотореакторі, що призводить до підвищеного приросту біомаси.

Таблиця 1

Вміст хлорофілів *a* та *b* у клітинах *Chlorella vulgaris* при культивуванні під дією освітлення різними довжинами хвиль

Зразок, №	Світлодіоди (20 шт)	Хлорофіл <i>a</i> , мг/г	Хлорофіл <i>b</i> , мг/г	Співвідношення хлорофілів <i>a/b</i>
1	Білі	10,34±0,31	4,01±0,1	2,58±0,2
2	Червоні/сині, (3:2)	19,34±0,58	3,40±0,1	5,69±0,2
3	Сині/жовті/червоні/помаранчеві, (2:2:5:1)	26,79±0,80	6,91±0,2	3,88±0,2
4	Червоні/сині/зелені, (1:1:1) (18 шт)	9,81±0,29	0,314±0,01	31,2±0,2
Контроль	Природне освітлення	10,29±0,31	1,51±0,05	6,81±0,2

Таким чином, для збільшення терміну фотосинтезу і підвищення виходу біомаси для вирощування мікродоростей можливо використовувати як природне освітлення, так і комбінації світлодіодів.

Для визначення раціонального співвідношення світлодіодів червоного, синього та зеленого діапазону для одержання максимального приросту біомаси *Chlorella vulgaris* було досліджено такі комбінації: (1:1:1), (2:1:1), (1:2:1), (1:1:2), відповідно.

На рис. 5 наведено приріст біомаси *Chlorella vulgaris* за 14 діб культивування при освітленні різними комбінаціями світлодіодів червоного, синього та зеленого діапазонів. Найбільший вихід біомаси характерний для культури, яку вирощували при освітленні комбінацією світлодіодів з перевагою червоного спектру (рис. 5, поз. 2). За рівного співвідношення світлодіодів (рис. 5, поз.1) вихід біомаси складав 76% від біомаси, одержаної з перевагою червоного кольору. Збільшення кількості синіх світлодіодів призводить до зниження приросту біомаси на 33% (рис.5, поз. 3), а зелених – у 2,5 рази (рис.5, поз.4). Таку залежність можна пояснити тим, що червоне опромінення постачає енергію для роботи хлорофілу *a*, який входить до складу обох фотосистем.

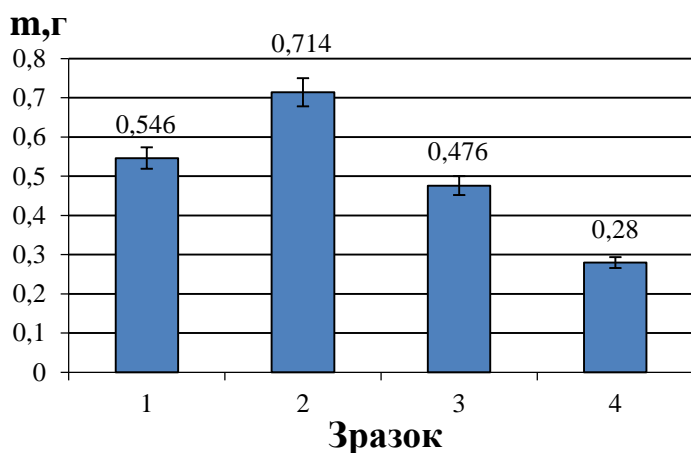


Рис. 5. Вихід біомаси *Chlorella vulgaris* (m) при освітленні штучним (40 шт. світлодіодів) світлом за використання комбінацій у співвідношенні червоні/сині/зелені:
1 - (1:1:1), 2 - (2:1:1), 3 - (1:2:1), 4 - (1:1:2). $P \leq 0,05$.

Такі відмінності у виході біомаси пов'язані з тим, що хлорофіл *a* - основний фотосинтетичний пігмент, має високу спорідненість до світла червоного спектру. Тому збільшення кількості червоних світлодіодів з довжиною хвилі, що характерна для хлорофілу *a*, призводить і до підвищення біосинтетичних процесів клітини і, відповідно, до збільшення швидкості накопичення біомаси. Також такий відгук клітин *Chlorella vulgaris* на освітлення можна пояснити негативним впливом високої інтенсивності низьких частот видимого спектра, що притаманно частотам синього кольору. При цьому кількість енергії, що надходить до клітини, знижується за рахунок зменшення дії частот, характерних для фотосистем I та II, і, відповідно, знижується біосинтез хлорофілу *a*. Збільшення синіх світлодіодів у комбінації призводить до зростання активності хлорофілу *b*, але цей хлорофіл є додатковим пігментом, який передає частину енергії збудження на хлорофіл *a*, енергія якого безпосередньо внаслідок послідовних реакцій у фотосистемах бере участь в утворенні багатих на енергію сполук - АТФ. Відповідно, підвищення кількості синіх світлодіодів і зменшення червоних призводить до зменшення приросту біомаси (рис.5, поз. 3), що не відповідає висновкам деяких робіт. Також при перевазі довжин хвиль синього спектру дуже швидко утворюються колонії, що впливає на проникнення освітлення в глибину фотореактора, і відповідно, на приріст біомаси. У випадку використання комбінації з більшою кількістю зелених світлодіодів (рис. 5, поз. 4) низький вихід

біомаси пов'язаний з нестачею енергії синього та червоного діапазонів для хлорофілів *a* і *b*, відповідно. Водночас використання світлодіодів зеленого кольору дає можливість частково подолати проблему зон затемнення, оскільки зелений квант має більшу енергію і здатний проникати глибше у густу суспензію, на відміну від квантів червоного спектру, та обмежено підтримувати роботу хлорофілу *a*.

Вперше встановлено, що приріст біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* залежить від довжини хвиль опромінення і їх співвідношення. Найвищий приріст біомаси характерний для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* за використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні (2:1:1) при інтенсивності освітлення 952 люкс. Використання такої комбінації світлодіодів окремо або разом з природнім світлом забезпечує високу фотосинтетичну активність мікроводоростей, що дозволяє збільшити вихід біомаси.

У п'ятому розділі обґрунтовано та досліджено вплив джерела нітрогену на розвиток мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та продукування ними ліпідів. Як джерело нітрогену обрано сполуки: NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , сечовину та екстракт посліду птахів.

Споживання переважно іону амонію як джерела нітрогену для середовищ, що містять різні сполуки, починається у фазі росту (табл. 2). NH_4^+ є кінцевим продуктом відновлення нітрату і зворотним інгібітором, що репресує поглинання нітрату. За використання посліду зменшення споживання іонів амонію після 10 доби та збільшення їх концентрації після 20 доби культивування можна пояснити виділенням з клітин іону амонію за асиміляції сечовини з розчину. Збільшення кількості нітрат іонів в останній період за використання NH_4NO_3 можливо відбувається за рахунок позбавлення клітиною їх надлишкової кількості, оскільки використання іону амонію для анаболізму потребує менших енергетичних витрат. За культивування *Chlorella vulgaris* на витяжці з посліду також збільшується фаза експонентного росту (до 8 – 10 діб).

Таблиця 2

Зміна концентрації іонів нітрату та амонію при культивуванні *Chlorella vulgaris* на середовищах з різними джерелами нітрогену

Доба	0		5		10		20		30	
Джерело нітрогену, мг/дм ³	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+
KNO_3	613,2 ±12		571,28 ± 11,4		544,36 ±10,5		502,8 ±10		455,5 ±9,1	
NH_4NO_3	305,6 ±6,1	88,7 ±1,8	268,7 ±0,2	64,33 ±0,2	252,6 ±0,2	46,9 ±0,2	229,2 ±0,1	39,5 ±0,2	207,3 ±0,2	31,9 ±0,1
NH_4Cl		177,4 ±3,5		145,7 ±0,6		112,2 ±0,4		87,2 ±0,3		64,6 ±0,3
Екстракт посліду	117,4 ±2,3	78,0 ±1,6	99,3 ±2,0	51,4 ±1,0	85,2 ±1,7	36,0 ±0,7	75,6 ±1,5	8,52 ±0,2	28,9 ±0,6	12,2 ±0,2

Найбільший приріст біомаси характерний для середовища з екстрактом посліду птахів, більш повільний - для середовища з NH_4Cl та сечовиною. Значно нижче накопичення біомаси спостерігається для середовища з NH_4NO_3 та

стандартного середовища з KNO_3 . Показано, що на початкових етапах культивування (10 діб) суспензія мікроводоростей у середовищі з послідом та $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ мала найвищі показники приросту біомаси. Вихід біомаси корелює зі зміною рН середовища в процесі культивування (табл.3). Значне підвищення значення рН за використання KNO_3 як джерела нітрогену призводить до уповільнення приросту біомаси.

Високу швидкість росту за використання посліду як джерела нітрогену можна пояснити постійним значенням рН, вмістом різних форм нітрогену та міксотрофними умовами культивування, оскільки за використання посліду джерелом карбону слугують як органічні речовини, так і CO_2 , який постачали в середовище з повітрям. Таким чином, для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою подальшого накопичення нею ліпідів як джерело нітрогену можна використовувати послід, хлорид амонію та сечовину.

Таблиця 3

Оптична густина та рН культуральних середовищ з різним вмістом джерела нітрогену на 30 добу культивування *Chlorella vulgaris*

Джерело нітрогену	Кількість клітин, • 10^7 кл/см ³	Густина, D_{450}	рН
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	11,9±0,05	0,45±0,02	8,4±0,3
NH_4NO_3	0,88±0,04	0,39±0,02	6,3±0,5
NH_4Cl	14,6±0,07	0,496±0,03	5,5±0,3
KNO_3	0,34±0,03	0,296±0,01	9,2±0,1
Екстракт посліду	39,4±0,36	0,92±0,03	7,1±0,1

На рис. 6 наведено вихід біомаси *Chlorella vulgaris* та ліпідів при одночасній дії ультразвукового опромінення та за різних джерел нітрогену. Як видно з рис. 6, при сумісній дії факторів на приріст біомаси більший вплив має опромінення, ніж джерело нітрогену. На біосинтез ліпідної фракції у *Chlorella vulgaris* впливає як ультразвукове опромінення, так і джерело нітрогену. Вищий вміст ліпідів характерний для клітин, що вирощували на середовищі з іонами амонію. Найбільший вміст ліпідної фракції спостерігається за використання NH_4Cl (рис. 6, рис. 7, поз.1) і досягає $43 \pm 2\%$. Високий вміст ліпідної фракції пов'язаний з низькими значеннями рН середовища, що сприяє біосинтезу триацилгліцеролів. За використання суміші (рис. 6, рис. 7, поз.3) вихід ліпідної фракції нижчий, але приріст біомаси дещо вищий, що підвищує загальний вихід ліпідів.

Використання тільки амонійного нітрогену призводить до збільшення виходу ліпідів у 2 рази по відношенню до нітратної форми та сечовини. За використання суміші іонів амонію та сечовини вихід ліпідів збільшується у 1,75 разів по відношенню до культивування мікроводоростей на середовищі з сечовиною як джерелом нітрогену.

Вищий приріст біомаси характерний для джерел нітрогену, що не потребує значних витрат енергії для їх використання клітиною. Рациональним джерелом нітрогену для культивування мікроводоростей є іони амонію та сечовина. Нітрат іони потребують джерела енергії для їх перетворення в амінну форму і призводять до залуговування середовища, що негативно впливає на приріст біомаси.

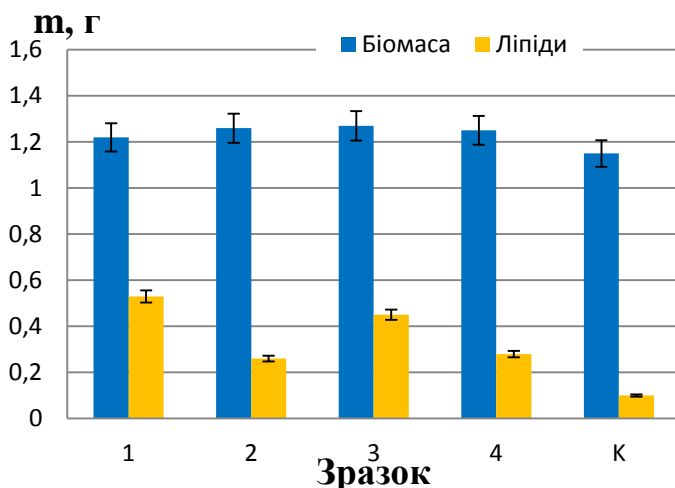


Рис. 6. Вихід біомаси та ліпідів мікроводоростей *Chlorella vulgaris* (m) при опроміненні ультразвуком за різного джерела нітрогену в середовищі:
1 - NH_4Cl , 2 - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 3 - NH_4Cl та $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (1:1), 4 - Громова №6, К - Громова №6 без ультразвукового опромінення, $t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$. $P \leq 0,05$.

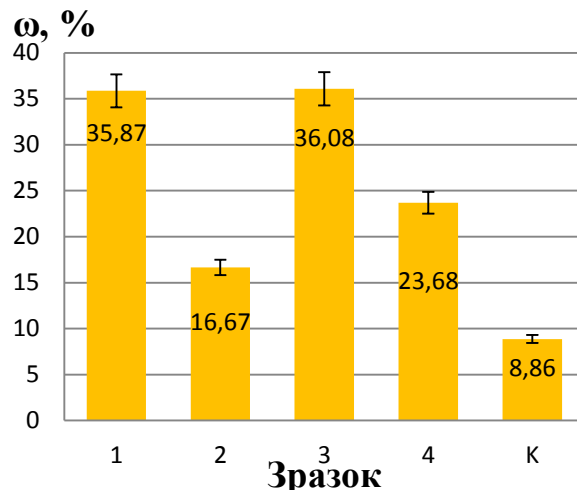


Рис. 7. Питомий вміст ліпідної фракції (ω) у *Chlorella vulgaris* в залежності від джерела нітрогену:
1 - NH_4Cl , 2 - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 3 - NH_4Cl та $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (1:1), 4 - Громова №6, К - Громова №6 без ультразвукового опромінення. $P \leq 0,05$.

Одержані результати є підґрунтям для створення технології культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів для отримання біодизельного палива.

У шостому розділі вперше встановлено технологічні параметри культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів. Досліджено одночасний вплив ультразвукового опромінення, освітлення комбінаціями з різним діапазоном довжин хвиль та джерела нітрогену на приріст біомаси мікроводоростей та продукування ліпідів.

Культуру мікроводоростей вирощували за використання природного освітлення у світловий період з одночасним періодичним освітленням світлодіодами. В період темряви режим освітлення світлодіодами був 4 години світло - 4 години темрява. Співвідношення червоних, зелених та синіх світлодіодів (2:1:1), відповідно. Ультразвукове опромінення частотою 20 кГц проводили 1 раз на добу протягом 1 хвилини. Як джерело нітрогену використовували хлорид амонію, сечовину та їх суміш у різному співвідношенні.

На рис. 8 наведено зміну приросту біомаси *Chlorella vulgaris* за 20 діб культивування в залежності від джерела нітрогену при одночасному ультразвуковому опроміненні та освітленні світлодіодами.

Як видно з рис. 8, найвищий приріст біомаси *Chlorella vulgaris* спостерігається за використання середовища з еквімолярним за нітрогеном співвідношенням суміші хлориду амонію та сечовини при опроміненні світлодіодами у комбінації червоні/сині/зелені (2:1:1).

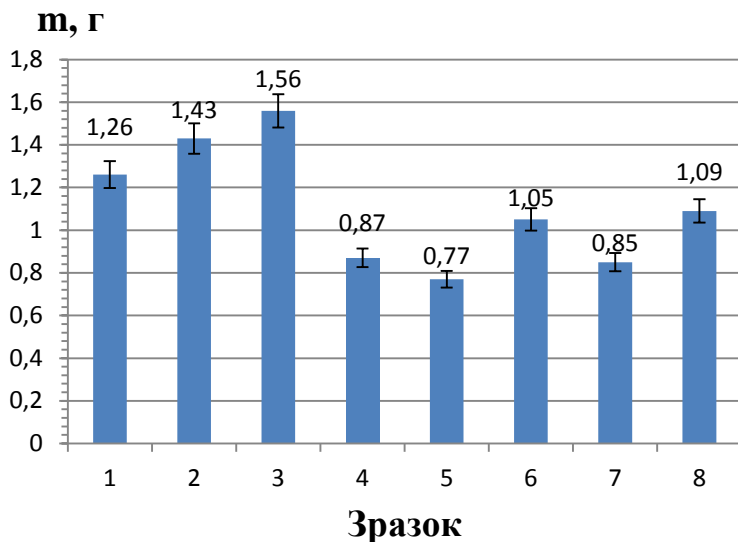


Рис. 8. Зміна приросту біомаси *Chlorella vulgaris* (m) в залежності від комбінації світлодіодів та джерела нітрогену:

(червоні/сині/зелені (2:1:1) - 1 - NH_4Cl , 2 - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, співвідношення $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$: 3 - 1:1, 4 - 3:7, 5 - 7:3, (червоні/сині/зелені (1:1:1) - співвідношення $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$: 6 - 1:1, 7 - 3:7, 8 - 7:3. $P \leq 0,05$.

Інше співвідношення джерел нітрогену призводить до значного зниження приросту біомаси (на 46 ± 2 % для співвідношення 3:7 та 50 ± 2 % для співвідношення 7:3) по відношенню до середовища зі співвідношенням 1:1. Використання однієї з форм нітрогену – або амонію, або сечовини - збільшує приріст біомаси по відношенню до нееквімолярних концентрацій нітрогену за використання різних сполук. Причому приріст біомаси за використання сечовини на 11% більше, ніж за використання іонів амонію. За використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні (1:1:1) відбувається зменшення приросту біомаси на 33% при використанні еквімолярної суміші джерел нітрогену. За використання співвідношення іонів амонію та сечовини 3:7 приріст біомаси не змінюється, при співвідношенні 7:3, відповідно, приріст збільшується на 30% і перевищує приріст біомаси в межах похибки при застосуванні співвідношення 1:1.

На рис. 9 наведено питомий вміст ліпідної фракції у біомасі при культивуванні мікроросточей за використання різних джерел нітрогену, освітленні світлодіодами та опроміненні ультразвуком.

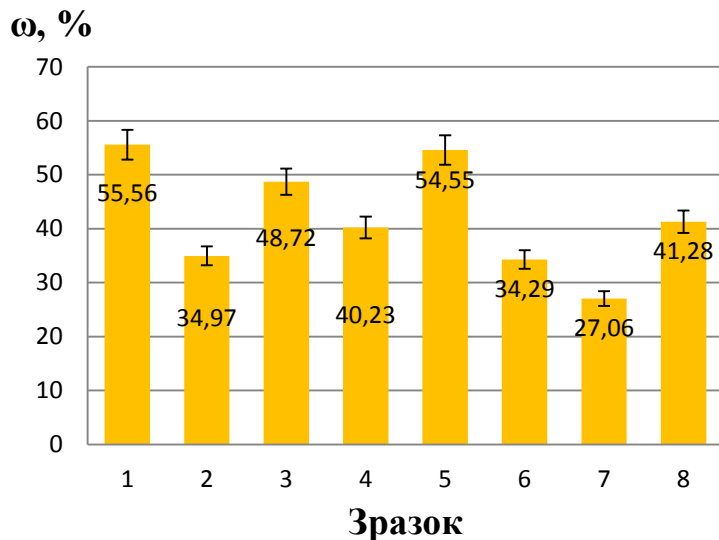


Рис.9. Питомий вміст ліпідів (ω) у клітинах *Chlorella vulgaris* в залежності від комбінації світлодіодів та джерела нітрогену:

(червоні/сині/зелені (2:1:1) - 1 - NH_4Cl , 2 - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, співвідношення $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$: 3 - 1:1, 4 - 3:7, 5 - 7:3, (червоні/сині/зелені (1:1:1) - співвідношення $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$: 6 - 1:1, 7 - 3:7, 8 - 7:3. $P \leq 0,05$.

Найбільший приріст біомаси, що характерний для культурального середовища з сумішшю сечовини та хлориду амонію, та сечовиною (рис. 8), не дає вищого виходу ліпідів. Збільшення продукування ліпідів характерне для середовища з вищим вмістом іонів амонію (поз.1, 5, 8, рис. 9). Водночас на вихід ліпідної фракції впливає співвідношення частот світлодіодів. При підвищенні інтенсивності червоного спектру опромінення збільшується не тільки приріст біомаси, а і концентрація ліпідної фракції у 1,3 – 1,5 разів в залежності від співвідношення джерел нітрогену (рис.9, поз. 3, 4, 5). За використання іонів амонію як єдиного джерела нітрогену вміст ліпідів в клітинах перевищує на 11% їх вміст при культивуванні на еквімолярній за нітрогеном суміші іонів амонію та сечовини.

Показано, що на швидкість приросту біомаси та метаболізм клітин *Chlorella vulgaris* одночасно впливає співвідношення діапазону хвиль освітлення, опромінення ультразвуком та джерело нітрогену. Найвища швидкість росту біомаси спостерігається за таких умов культивування: періодичного опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, одночасного використання природного та штучного освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (2:1:1) та суміші $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ у співвідношенні за нітрогеном 1:1. Зміна співвідношення комбінації довжин хвиль світлодіодів на (1:1:1) призводить до зниження приросту біомаси на $33 \pm 2\%$. Вплив зміни співвідношення джерел нітрогену залежить від комбінації світлодіодів. За використання комбінації світлодіодів (2:1:1) приріст біомаси зменшується на $44 \pm 3\%$ при будь-якому відхиленні від еквімолярної концентрації за нітрогеном суміші $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, за комбінації (1:1:1) - збільшується при збільшенні концентрації іонів амонію.

Для прогнозування якості біодизельного палива визначено якісний вміст жирних кислот при одночасній дії на клітини мікроводоростей фізичних факторів (табл. 4). Так, дія освітлення червоним, синім та зеленим діапазонами довжин хвиль (1:1:1) та ультразвуку (20 кГц) підвищує біосинтез насичених жирних кислот, особливо C13, C16 та C18, в той час як зміна тільки діапазону освітлення з природного на комбінацію світлодіодів призводить до збільшення ненасичених жирних кислот – олеїнової, лінолевої та ліноленової.

Таблиця 4

**Склад жирних кислот у ліпідах мікроводоростей *Chlorella vulgaris* при дії
ультразвукового опромінення та освітлення світлодіодами**

№пп	Кислота	Вміст кислот за сумісної дії фізичних факторів, %	Вміст кислот при освітленні світлодіодами, %	Вміст кислот при природному освітленні, % [Semin O., 2001]	Вміст кислот в олії з ріпаку [Sakhno L., 2010]
1	тридеканова	$27,76 \pm 1,38$	$22,22 \pm 1,11$	$16,6 \pm 0,83$	-
2	пальмітинова	$40,04 \pm 2,02$	$38,83 \pm 1,94$	$37,2 \pm 1,86$	$5 \pm 0,25$
3	гептадеценева	$2,64 \pm 0,13$	$1,77 \pm 0,02$	$4,9 \pm 0,25$	-
4	стеаринова	$20,11 \pm 1$	$18,85 \pm 0,94$	$11,57 \pm 0,58$	$7,8 \pm 0,39$
5	олеїнова	$3,64 \pm 0,18$	$8,97 \pm 0,45$	$17,25 \pm 0,86$	$57,9 \pm 2,9$
6	лінолева	$3,94 \pm 0,2$	$6,07 \pm 0,3$	$11,97 \pm 0,6$	$21 \pm 1,05$
7	ліноленова	$1,87 \pm 0,09$	$3,28 \pm 0,16$	$0,51 \pm 0,02$	$10,3 \pm 0,52$

Також змінюється вміст жирних кислот за застосування світлодіодів по відношенню до природного освітлення. Використання червоного, синього та

зеленого діапазонів хвиль зміщує біосинтез в бік насичених жирних кислот, значно зменшуючи долю ненасичених жирних кислот (олеїнової) (табл. 4). Такий склад жирних кислот дасть змогу отримати біодизельне паливо, що відповідає Європейському стандарту (табл. 4).

Вперше показано, що сумісна дія фізичних факторів впливає на якісний склад вищих жирних кислот ліпідної фракції. За використання освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (1:1:1) збільшується вміст насичених жирних кислот і зменшується в 1,62 рази вміст ненасичених по відношенню до культури, що вирощена за використання природного освітлення. Сумісна дія ультразвукового опромінення та освітлення комбінацією світлодіодів (1:1:1) призводить до збільшення вмісту насичених жирних кислот до $90,55 \pm 1,0\%$, що на 10% вище, ніж при застосуванні тільки освітлення світлодіодами.

На рис.10 наведено фрагмент технологічної схеми процесу культивування мікрободоростей.

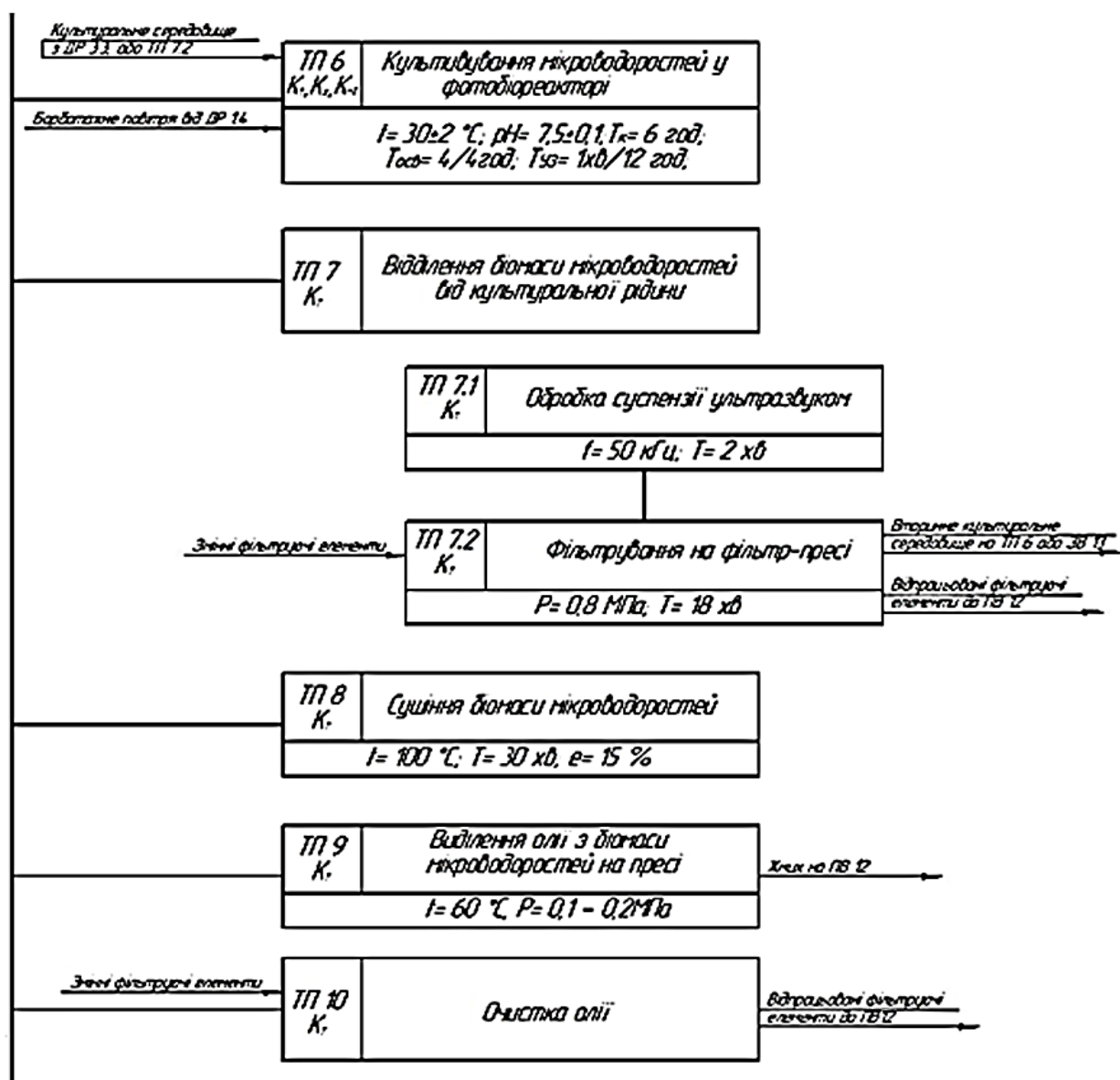


Рис. 10. Фрагмент технологічної схеми культивування мікрободоростей та одержання олії

На основі одержаних результатів обґрунтовано раціональні технологічні режими культивування *Chlorella vulgaris* для підвищення біосинтезу клітинами триацилгліцеролів. Експериментально одержані дані стали підґрунтям для розробки біотехнології культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідної фракції для отримання з них біодизельного палива. Запропоновано технологічну та відповідну їй апаратурну схеми культивування мікроводоростей та одержання з біомаси біодизельного палива.

У додатках наведено акти випробувань та впровадження біотехнології у виробництво, акти використання наведених результатів у навчальному процесі та техніко-економічні показники культивування мікроводоростей та виробництва з них біодизелю з мікроводоростей.

ВИСНОВКИ

Отримані теоретичні та експериментальні результати стали підґрунтям для вирішення важливої науково-технологічної проблеми підвищення вмісту ліпідної фракції у клітинах розповсюдженої в Україні мікроводорості *Chlorella vulgaris*, що дозволило створити ефективну біотехнологію культивування мікроводоростей з високим вмістом ліпідів, як вихідної сировини для отримання біодизельного палива.

1. Обґрунтовано та експериментально доведено вплив опромінення звуковими та ультразвуковими хвилями різної частоти на метаболізм клітин мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та підвищення швидкості біосинтетичних процесів. Показано, що опромінення хвилями звукових частот $5 \div 15$ кГц дозволяє підвищити вміст ліпідної фракції в клітинах у $1,5 \div 2$ рази по відношенню до неопроміненої культури. Встановлено, що нетривала дія опромінення ультразвуковими хвилями частотою $20 \div 25$ кГц призводить як до підвищеного приросту біомаси *Chlorella vulgaris*, так і до інтенсифікації біосинтезу ліпідів. Питомий вміст ліпідів у клітинах досягає 80% при опроміненні хвилями частотою 22,5 кГц. При підвищенні чи зниженні частоти опромінення вміст ліпідів зменшується до 55% при 20 кГц та 32% при 25 кГц. Дія опромінення ультразвуковими хвилями дає змогу створити умови для зміни метаболізму клітин в бік утворення ліпідної фракції і можливості використання *Chlorella vulgaris* як продуцента сировини для отримання біодизельного палива.

2. Встановлено, що дія ультразвуку ($20 \div 25$ кГц) призводить до підвищення швидкості біосинтезу і приросту біомаси. Підвищення частоти ультразвукового опромінення більше 20 кГц призводить до зниження приросту біомаси у 3 рази при 22,5 кГц та 3,5 рази при 25 кГц. Одержані результати свідчать, що раціональним параметром процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів є опромінення культури ультразвуком частотою 20 кГц.

3. Показано, що опромінення комбінаціями світлодіодів з перевагою червоного кольору (синій/червоний 2:3; синій/жовтий/червоний/помаранчевий, 2:2:5:1) підвищує біосинтез хлорофілу *a* у 2 рази у порівнянні з природним освітленням. Вперше встановлено, що найвищий приріст біомаси характерний для

культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* за використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні 2:1:1 при інтенсивності освітлення 950 ± 50 люкс. Використання такої комбінації світлодіодів окремо або разом з природним світлом дає змогу підвищити швидкість засвоєння CO_2 та накопичення біомаси у 1,3 – 2,6 разів у порівнянні з іншими комбінаціями світлодіодів.

4. Визначено, що процес біосинтезу ліпідної фракції має прямо пропорційну залежність від концентрації іонів амонію. Заміна сечовини як джерела нітрогену на іони амонію збільшує вміст ліпідів на $66 \pm 3\%$. За використання іонів амонію як джерела нітрогену вміст ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* досягає $43,4 \pm 0,5\%$.

5. Вперше показано залежність метаболізму клітин *Chlorella vulgaris* від одночасної дії фізичних (освітлення комбінацією світлодіодів та опромінення ультразвуком) та хімічних (джерело нітрогену) факторів – раціональними є такі умови культивування: періодичне опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, одночасне використання природного та штучного освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (2:1:1) та суміші $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ у співвідношенні за нітрогеном 1:1.

6. Вперше показано, що сумісна дія фізичних факторів впливає на якісний склад вищих жирних кислот ліпідної фракції. За використання освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (1:1:1) збільшується вміст насичених жирних кислот до $81,0 \pm 1,0\%$ і зменшується в 1,62 рази вміст ненасичених у порівнянні до культури, що вирощена за використання природного освітлення. Сумісна дія ультразвукового опромінення та освітлення комбінацією світлодіодів (1:1:1) призводить до збільшення вмісту насичених жирних кислот до $90,55 \pm 1,0\%$, що на 10% вище, ніж при застосуванні тільки освітлення світлодіодами. Це дає змогу отримати біодизельне паливо без застосування гідрогенізації сировини для підвищення виходу насичених жирних кислот.

7. Визначено параметри біотехнологічного процесу культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідної фракції для отримання біодизельного палива: температура 30 ± 2 °C, періодична подача CO_2 , освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені у співвідношенні (2:1:1), періодичне опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, $\text{pH} = 7,3 \pm 0,2$, еквімолярна суміш за нітрогеном $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Обґрунтовано і запропоновано технологічну та відповідну їй апаратурну схеми культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів та отримання біодизельного палива. Розроблену технологію апробовано на підприємстві ТОВ «Авангард», Черкаська область, Жашківський район, що підтверджено актами впровадження від 06.09.2016 р. Наукові результати роботи впроваджено у навчальному процесі для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» спеціалізації «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (акт впровадження від 08.09.2016 р.).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Голуб Н.Б. Утилизация помёта *Chlorella vulgaris* для получения биодизельного топлива / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Вода и екологія: проблемы и решения. – 2014. – №1. – С. 151–157. (Науково-технічний фаховий журнал Російської Федерації, <http://www.wemag.ru/>. Входить до міжнародної наукометричної бази РІНЦ, Library.ru, Scopus, Ulrichs web). (Особистий внесок дисертанта: брав участь у проведенні експерименту, сконструював лабораторну установку для культивування)
2. Голуб Н.Б. Вплив джерела азотного живлення на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, Є.Д. Тимошенко // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2015. – Вип. 101. – № 3. – С.7–14. (Фахове видання з технічних наук. Входить до міжнародної наукометричної бази РІНЦ, WorldCat, Google Scholar, OpenAIRE, EBSCO). (Особистий внесок дисертанта: брав участь у підготовці та проведенні частини експерименту, підготовці статті)
3. Голуб Н.Б. Підвищення вмісту ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун // Відновлювана енергетика. – 2015, – Вип. 40, – №1, – С. 86–89. (Фахове видання з технічних наук). (Особистий внесок дисертанта: сконструював дослідну установку та досліджував вплив ультразвукового опромінення на процес культивування мікроводоростей, визначив вміст ліпідної фракції у досліджуваних мікроводоростях)
4. Golub N.B. Impact of sound irradiation on *Chlorella vulgaris* cell metabolism / N.B. Golub, І.І. Levkun // Eastern-European journal of enterprise technologies. – 2016, – Vol. 80, – № 2, – Р. 27–31. (Фахове видання з технічних наук. Входить до міжнародної наукометричної бази РІНЦ, Scopus, EBSCO, DOAJ, Index Copernicus, Library.ru, WorldCat, BASE, CAS, Driver). (Особистий внесок дисертанта: сконструював пристрій для здійснення впливу коливань звукового спектру на культуру, проводив дослідження зміни приросту біомаси та вмісту ліпідів, брав участь у написанні статті)
5. Golub N.B. Influence of light energy wavelength on cultivation of *Chlorella vulgaris* / N.B. Golub, І.І. Levkun // Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». –2016. – Вип. 841. – С 138–144. (Фахове видання з технічних наук). (Особистий внесок дисертанта: сконструював установку для визначення впливу довжин хвилі світлового спектру на ріст та розвиток мікроводоростей, брав участь у виконанні експерименту та написанні статті)
6. Патент України на винахід № 110770 UA, МПК (2006.01), C12N1/12, C12M1/42, C12R1/89. Спосіб культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* / Голуб Н.Б., Левтун І.І. № a201509805; Заявл. 09.10.2015; Опубл. 10.02.2016; Бюл. № 2, 2016 р. (Особистий внесок дисертанта: проводив патентний пошук найближчих аналогів, брав участь у підготовці патенту)
7. Патент України на корисну модель № 98655 UA, A01G 33/00, C12M 3/02. Установка для культивування мікроводоростей / Голуб Н.Б. (UA), Левтун І.І. (UA), Хворостина О.В. (UA) - Заявка № u201407870, 14.07.2014; Оп. 12.05.2015 р.

(Особистий внесок дисертанта: виконував креслення для установки, брав участь у підготовці патенту)

8. Левтун І.І. Біопаливо з мікроводоростей / І.І. Левтун // Матеріали XIV міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство» (18–22 травня 2011р.) – м. Київ, 2011. – С. 230.

9. Левтун І.І. Оптимізація культивування мікроводоростей з метою одержання біодизельного пального / І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Матеріали XV міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство» (26–30 вересня 2012р.) – м. Київ, 2012. – С. 113. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь у проведенні експерименту, визначав вміст ліпідної фракції в клітинах мікроводоростей)

10. Левтун І.І. Оптимізація культивування мікроводоростей з метою одержання біодизельного пального / І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Матеріали XV міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство» (26–30 вересня 2012р.) – м. Київ, 2012. – С. 118. (Особистий внесок дисертанта: визначив кількість біомаси мікроводоростей в залежності від джерела живлення)

11. Левтун І.І. Одержання біодизельного пального при біологічній утилізації CO_2 / І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Матеріали XV міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство» (26–30 вересня 2012р.) – м. Київ, 2012. – С. 114. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь в проведенні експерименту, дослідив динаміку зміни рН)

12. Голуб Н.Б. Одержання біодизельного пального при біологічній утилізації CO_2 / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Матеріали XIII міжнародної конференції «Відновлювана енергетика XXI століття» (10–14 вересня 2012р.) – АР Крим, 2012. – С. 564–569. (Особистий внесок дисертанта: брав участь у проведенні експерименту)

13. Голуб Н.Б. Оптимізація культивування мікроводоростей для одержання біодизельного пального / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.В. Хворостина // Матеріали XIV міжнародної конференції «Відновлювана енергетика XXI століття» (16–20 вересня 2013р.) – АР Крим, 2013. – С. 447–449. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь у проведенні експерименту, та обговоренні результатів)

14. Голуб Н.Б. Вплив ультразвукового опромінення на продукування ліпідів *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун // Матеріали XV ювілейної міжнародної конференції «Відновлювана енергетика XXI століття» (16–17 вересня 2014р.) – м. Київ 2014. – С. 361–363. (Особистий внесок дисертанта: сконструював систему ультразвукового опромінення, досліджував ріст та розвиток культури при ультразвуковому опроміненні різними частотами, приймав участь в обговоренні результатів)

15. Голуб Н.Б. Технологічне рішення підвищення енергоемності біогазу / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.А. Козловець // Міжнародна науково-практична конференція «Відновлювальна енергетика та енергоефективність у XXI столітті», – м. Київ 2015, – С. 341–344. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь у проведенні експерименту, приймав участь у підготовці тез)

16. Левтун І.І. Залежність приросту біомаси *Chlorella vulgaris* від джерел заліза та азоту / І.І. Левтун, Є.Д. Тимошенко // Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», – м. Київ 2015, – С. 114–115. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь в проведенні експерименту, обговоренні результатів та написанні тез)

17. Левтун І.І. Одержання біопалива з мікроводоростей / І.І. Левтун // V регіональна науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (26 квітня 2011р.) – м. Київ 2011, – С. 108.

18. Голуб Н.Б. Математичне моделювання процесу вирощування мікроводоростей за використання біогазу / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.А. Козловець, Д.В. Воєвода // Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (24 квітня 2015р.), – м. Київ 2015, – С. 146. (Особистий внесок дисертанта: приймав участь в експерименті та обговоренні математичної моделі)

19. Голуб Н.Б. Об'єднання процесу очищення біогазу від вуглекислоти з процесом культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, О.А. Козловець, Д.В. Воєвода // Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (24 квітня 2015р.), – м. Київ 2015, – С. 147. (Особистий внесок дисертанта: брав участь у проведенні експерименту, і підготовці тез)

20. Голуб Н.Б. Використання штучного світла для культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, І.І. Левтун // 17 Міжнародна науково-практична конференція «Відновлювальна енергетика та енергоефективність» (29–30 вересня), – м. Київ 2016, – С. 531–533. (Особистий внесок дисертанта: сконструював установку для дослідження впливу різних комбінацій світлодіодів, досліджував морфологічні зміни клітин та процеси формування колоній за дії різних комбінацій довжин хвиль)

АНОТАЦІЯ

Левтун І.І. Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського», Київ, 2017.

Дисертація присвячена науково-технологічним основам біотехнології культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів з метою подальшого одержання біодизельного палива.

Обґрунтовано та визначено умови культивування, за яких спостерігається раціональне співвідношення виходу біомаси та ліпідної фракції, при дії на культуру *Chlorella vulgaris* ультразвукового опромінення, інтенсивності та комбінації довжин хвиль світлового опромінення, зміні джерела нітрогену у складі поживного середовища.

Експериментально визначено раціональні параметри технологічного процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* при поєднанні фізичних та

хімічних методів впливу для спрямування метаболізму клітин у бік синтезу ліпідної фракції.

Показано можливість виробництва біодизелю з мікроводоростей.

Розроблено технологічну та апаратурні схеми культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів та виробництва з них біодизелю.

Ключові слова: мікроводорості, *Chlorella vulgaris*, біодизель, ультразвукове опромінення, світлодіодне освітлення, культивування, джерело азоту, ліпіди.

SUMMARY

Levtun I.I. Biotechnology for Microalgae *Chlorella vulgaris* cultivation with high lipid contents. – Manuscript.

Thesis for the candidate of technical sciences degree in specialty 03.00.20 - biotechnology. – National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv, 2017.

Dissertation is devoted to scientific and technological bases of microalgae cultivation biotechnology with high lipids content for further biodiesel production.

Substantiated and established technological cultivation parameters, which provide a rational ratio of biomass and lipid fraction yields in *Chlorella vulgaris* culture, under influence of ultrasonic treatment, intensity and combination of light wavelengths, changes in nitrogen source in cultural medium.

Experimentally determined rational parameters for technological process of *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation process under the influence of physical and chemical methods combination to direct cell metabolism to produce saturated fatty acids.

Developed technological and instrumental scheme of microalgae cultivation with a high lipids content with following biodiesel production.

Key words: microalgae, *Chlorella vulgaris*, biodiesel, ultrasonic treatment, LED light, cultivation, nitrogen source, lipids.

АННОТАЦИЯ

Левтун И.И. Биотехнология культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт им. Игоря Сикорского», Киев, 2017.

Диссертация посвящена научно-технологическим основам биотехнологии культивирования микроводорослей с повышенным содержанием липидов с целью дальнейшего получения биодизельного топлива.

Обосновано и установлено технологические параметры культивирования, при которых наблюдается рациональное соотношение выхода биомассы и липидной фракции, при воздействии на культуру *Chlorella vulgaris* ультразвукового облучения, интенсивности и комбинации длин волн светового облучения, изменении источника азота в составе питательной среды.

Показано, что облучение звуковыми частотами $5 \div 15$ кГц приводит к повышению содержания в клетках микроводорослей липидной фракции в $1,5 \div 2$ раза по сравнению с культурой, которую не подвергали облучению. Установлено, что кратковременное действие ультразвука частотой $20 \div 25$ кГц приводит как к повышению прироста биомассы *Chlorella vulgaris*, так и к интенсификации биосинтеза липидов. Удельное содержание липидов зависит от частоты облучения ультразвуком. Максимальная концентрация липидов (80%) характерна для культуры, которую облучали ультразвуком частотой 22,5 кГц. При повышении или снижении частоты концентрация липидов уменьшается до 55% при частоте 20 кГц и до 32% при 25 кГц. Показано, что при повышении частоты с 20 до 25 кГц скорость прироста биомассы уменьшается, хотя и превышает скорость прироста необлученной культуры.

Полученные результаты показывают, что рациональной для культивирования *Chlorella vulgaris* с целью производства биодизеля является частота 20 кГц. Действие ультразвуковых частот 22,5 и 25 кГц приводит к понижению прироста биомассы в $3 \div 4$ раза по сравнению с культурой, которую облучали ультразвуком с частотой 20 кГц. Применение ультразвукового облучения дает возможность использовать *Chlorella vulgaris* как продуцент сырья для получения биодизельного топлива.

Экспериментально определено оптимальное соотношение комбинации светодиодов для освещения культуры. Показано, что применение комбинации с преобладанием красного спектра повышает биосинтез хлорофиллов в сравнении с природным освещением. Установлено, что использование зеленых светодиодов в комбинации с синими и красными приводит к повышению прироста биомассы. Использование комбинации синих, красных и зеленых светодиодов приводит к повышению скорости усвоения CO_2 и увеличению прироста биомассы по сравнению с другими комбинациями и природным светом.

Определено, что процесс биосинтеза неполярных липидов имеет пропорциональную зависимость от концентрации ионов аммония.

Впервые показано, что совместное действие физических факторов (освещение комбинацией светодиодов и облучение ультразвуком) влияет на качественный состав жирных кислот в составе липидной фракции. При использовании в системе освещения комбинации красных, синих и зеленых светодиодов совместно с ультразвуковым облучением, увеличивается содержание насыщенных жирных кислот до $90,55 \pm 1,0\%$ и уменьшает содержание ненасыщенных по сравнению с культурой, выращенной при природном освещении. Это дает возможность получать биодизельное топливо без необходимости проводить гидрогенизацию сырья.

Экспериментально определены рациональные параметры технологического процесса культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* при сочетании физических и химических методов воздействия для направления метаболизма клеток в сторону синтеза насыщенных жирных кислот.

Теоретически обоснована возможность использования отходов птицефабрик в качестве питательной среды для микроводорослей *Chlorella vulgaris* в предложенной технологии.

Разработана технологическая и аппаратная схемы культивирования микроводорослей с повышенным содержанием липидов и производства из них биодизеля.

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, биодизель, ультразвуковое облучение, светодиодное освещение, культивирование, источник азота, липиды.